

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEUROFARMACOLOGIA

MODULACION OPIOIDE Y NITRIDERGICA DE DICLOFENACO Y
NAPROXENO EN ANALGESIA E INFLAMACION EXPERIMENTAL

Macarena Moreira Escobar

TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO
DE CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Hugo Miranda G.

TUTOR ASOCIADO
Prof. Dr. Gianni Pinardi T.

SANTIAGO – CHILE
2005

INDICE

	Páginas
Marco Teórico e Introducción	1
Hipótesis	27
Objetivos	28
Material y Método	29
Resultados	33
Discusión	51
Conclusiones	54
Resumen	55
Bibliografía	56

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres y hermanas por su apoyo y cariño constante y por haberme entregado las herramientas para ser una mejor persona.
- Al Dr. Hugo Miranda y al Dr. Gianni Pinardi por haberme guiado, mediante su ayuda y experiencia para así lograr llevar a cabo este trabajo.
- Al Sr. José Lopez y al Sr. Alejandro Correa por toda la colaboración entregada en el laboratorio.
- A mis amigos que me acompañaron a lo largo de toda la carrera y que hicieron más gratos estos años de estudio.

INTRODUCCION Y MARCO TEORICO

La definición más comúnmente aceptada del dolor es la proporcionada por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), que lo define de la siguiente forma: "El dolor es una experiencia sensorial y emocional no placentera relacionada con daño potencial o real del tejido, o descrita en términos de tal daño. El dolor siempre es subjetivo. (1)

El daño tisular determina tres tipos de dolor: a) nociceptivo: provocado por estímulos de los nociceptores del dolor en cualquier tejido; b) neuropático: por lesión de las vías o centros nerviosos del dolor (centrales o periféricos), c) psicógeno: no se objetiva daño tisular. (2)

El conocimiento de la neuroanatomía y de la neurofisiología del dolor constituyen las bases que sustentan su tratamiento racional. De ahí la importancia clínica de conocer estos procesos en forma general. Los fenómenos que participan en el proceso nociceptivo pueden esquematizarse en los cuatro siguientes aspectos:

TRANSDUCCION

Este proceso ocurre en las terminaciones nerviosas libres, ramificaciones distales de fibras C amielínicas y de fibras $A\delta$, que a este nivel han perdido su

delgada capa de mielina. Allí se inicia la depolarización y la transmisión de los impulsos dolorosos hacia la médula. La respuesta de estos receptores periféricos puede ser modificada por factores que la sensibilizan, aumentando la respuesta (acidez del medio, presencia de sustancias algógenas como prostaglandinas o bradicininas) o por otros que causan fatiga, disminuyendo su respuesta (estímulos mecánicos repetidos). Algunos receptores sólo responden a estímulos mecánicos intensos, otros a estímulos nocivos mecánicos y térmicos y otros tienen respuestas polimodales ante estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Estos receptores aumentan significativamente su respuesta eléctrica cuando los estímulos se hacen dolorosos. (3,4,5,6)

TRANSMISION DE LA PERIFERIA A LA MEDULA

Con algunas excepciones, todos los impulsos dolorosos se transmiten por fibras C, con velocidad de conducción lenta (0,5-2 m/seg) y por las fibras A δ , con mayor velocidad de conducción (4-30 m/seg). Estas fibras, parten de la neurona en T o neurona periférica, tienen su soma en el ganglio espinal y penetran a la médula por el asta posterior. Las fibras de las astas anteriores, que se pensaba eran solo eferentes y motoras, transmiten también impulsos sensoriales en más de un 15% (Figura1). (4,6,7,8)

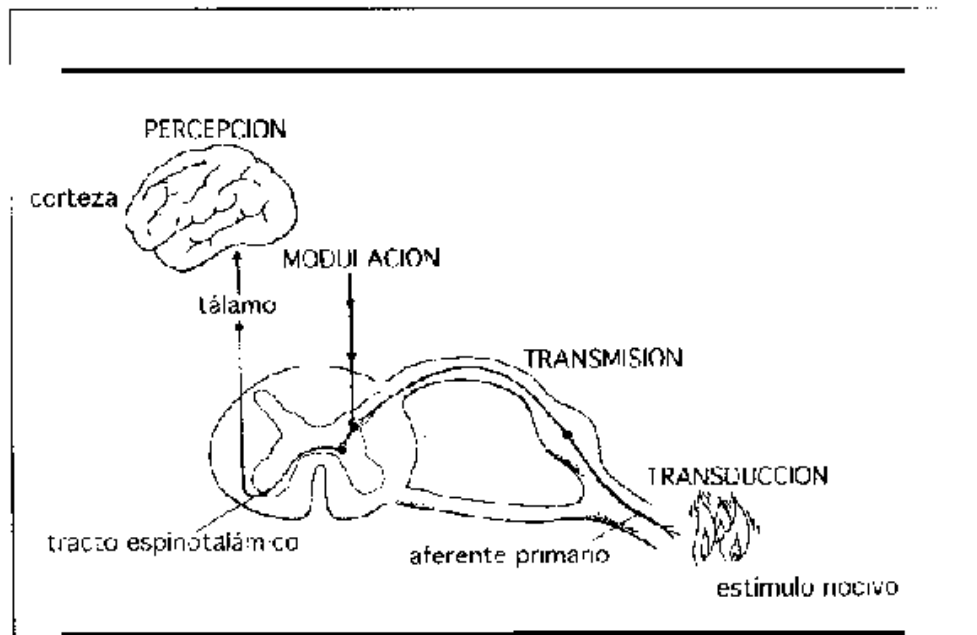


Figura 1 Representación esquemática del proceso nociceptivo: transducción, transmisión, percepción y modulación. (2)

En relación al dolor visceral, las vías aferentes son fibras simpáticas que, pasando por los plexos, llegan a la médula a través de las astas posteriores. Esta transmisión por fibras amielínicas y de conducción lenta, y que también puede ser somática, es responsable de una sensación dolorosa sorda, vaga y profunda. La sensación dolorosa más definida, intensa y breve, que se puede percibir ante un estímulo somático, es transmitida por las fibras A δ . Lo característico de las fibras sensitivas es su ingreso a la médula, siguiendo una cierta distribución topográfica, de manera que a cada dermatoma sensitivo le

corresponde un metámero medular, aún cuando existe un cierto grado de superposición. En las astas posteriores de la médula se produce la sinapsis con la segunda neurona en la sustancia gelatinosa de Rolando. Muchas fibras nociceptivas, antes de su ingreso a la sustancia gris, emiten colaterales descendentes y ascendentes, constituyendo parte del haz de Lissauer. Estas colaterales tienen la posibilidad de formar sinapsis hasta dos segmentos medulares inferiores o superiores al del ingreso, lo que significa que la transmisión de una neurona primaria puede propagarse a varias raíces vecinas. (7,8).

Es importante destacar que la segunda neurona puede formar sinapsis con más de una primera neurona, proveniente de la piel o de una víscera, y que esta sinapsis se produce siempre en la sustancia gelatinosa de Rolando, cualquiera sea la distribución del soma en el asta posterior. Aquí existen pequeñas neuronas características de esta zona, las interneuronas, que de alguna manera modulan estas sinapsis. Estos hechos tienen importancia, pues dan un sustrato anátomo-fisiológico a fenómenos como el dolor referido y a la modulación que sobre la transmisión nerviosa pueden ejercer centros superiores. (6,7,8)

VIAS ASCENDENTES

Las segundas neuronas dan origen a tres haces ascendentes contralaterales: el neoespinotalámico y el paleoespinotalámico, que conforman la vía espinotalámica, y el espinoreticulotalámico (Figura 2). (4,7,8)

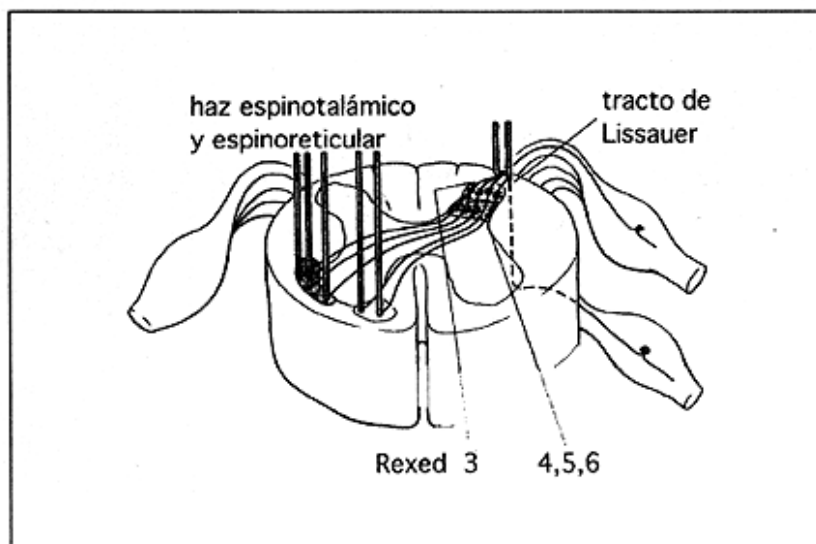


Figura 2. Transmisión del dolor en la médula espinal. (2)

Las fibras cruzan entre el epéndimo y la comisura gris anterior, cruce que puede realizarse en el mismo segmento medular o ascender antes de hacerlo. Algunos axones ascienden en forma ipsilateral y otros lo hacen a través de los cordones posteriores que conducen fibras propioceptivas de tipo A, para luego cruzar a nivel del bulbo y ascender al tálamo (Figura 3). (7,8)

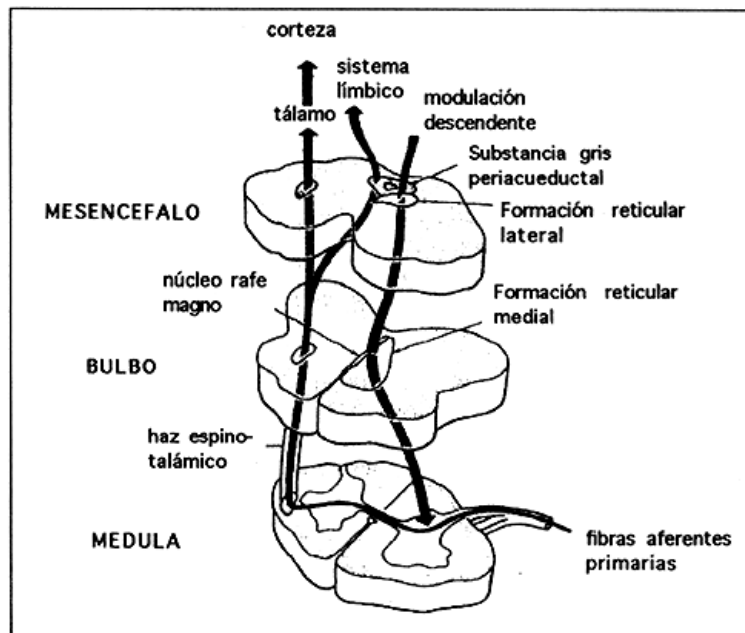


Figura 3. Vías ascendentes, vías descendentes y modulación del dolor.

(2)

El haz neoespinothalámico, que hace sinapsis con los núcleos ventral posterior y pósterolateral del tálamo y de allí con la corteza parietal, parece ser importante en la ubicación topográfica del dolor. El haz paleoespinothalámico se proyecta en forma bilateral a los núcleos inespecíficos del tálamo y luego a zonas frontales de la corteza, adquiriendo importancia en la evaluación cualitativa del dolor. El haz espino-reticulothalámico hace sinapsis con la formación reticular a diferentes niveles: bulbo, protuberancia, zona mesencefálica y sustancia gris periacueductal y de allí en forma bilateral hacia

los núcleos inespecíficos del tálamo; a este haz se le atribuye mayor importancia en relación al componente afectivo del dolor. (7,8,9).

VIAS DESCENDENTES

La estimulación eléctrica de la zona periacueductal o del núcleo del rafe bulbar, ricos en receptores morfínicos, provoca analgesia sin alteración motora, probablemente a través de una vía inhibitoria descendente, el fascículo dorsolateral. (Figura 3). Experimentalmente se puede obtener analgesia con microinyecciones de morfina en estas zonas. (10). Estas vías inhibitorias descendentes también pueden ser estimuladas por el dolor y el estrés y provocar alguna modulación a nivel medular. Es necesario dejar en claro que existen sistemas inhibidores descendentes mediados por opioides y también por otros mediadores, entre los que destacan dos sistemas: uno mediado por noradrenalina y otro por serotonina. (10,11)

MODULACION Y CONTROL DEL DOLOR

El dolor puede entonces iniciarse a través de la activación de receptores periféricos directamente dañados por el trauma o estimulados por fenómenos inflamatorios, infecciosos o isquémicos, que producen liberación de mediadores. Estos pueden ser directamente algógenos o sensibilizar a los

receptores. (5,6). El fenómeno inflamatorio incluye la liberación de sustancias como la histamina, serotonina, prostaglandinas y bradiquinina, el aumento del potasio extracelular y de iones hidrógeno, que facilitan el dolor. La sustancia P, un neurotransmisor que se sintetiza en el soma de la neurona periférica y de gran importancia a nivel medular, puede ser liberado también a nivel periférico, facilitando la transmisión nerviosa o incluso provocando vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y edema. Por otra parte, un estímulo traumático o quirúrgico intenso puede provocar una contractura muscular refleja, que agrava el dolor en la zona, o un aumento de la actividad simpática eferente, que a su vez modifica la sensibilidad de los receptores del dolor. (6,11,12). A nivel periférico se puede intentar modificar el dolor a diferentes niveles:

- 1) La infiltración de una herida con anestésicos locales o su uso intravenoso en una extremidad impiden la transducción al estabilizar la membrana de los receptores. Esta analgesia puede mejorarse utilizando narcóticos, probablemente por la existencia de receptores morfínicos a nivel periférico.
- 2) El bloqueo de un nervio periférico con anestésicos locales o su destrucción impide la transmisión de impulsos hacia y desde la médula espinal (Figura 4).

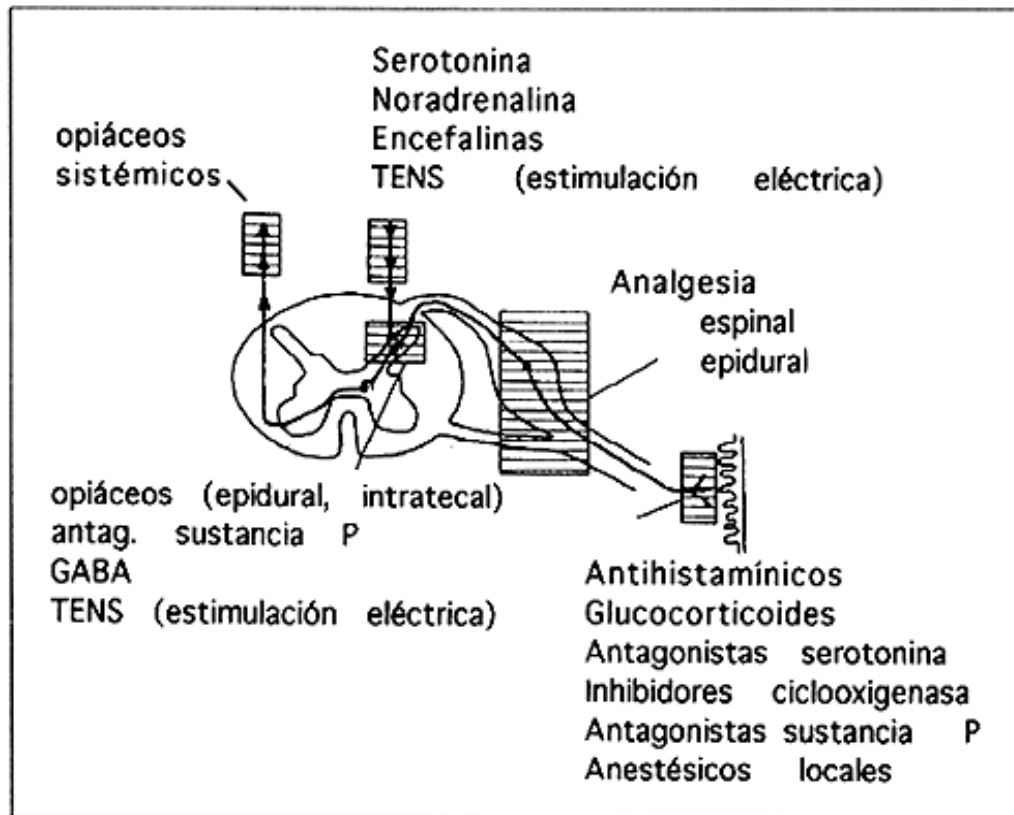


Figura 4. Sitios de acción de moduladores endógenos y de procedimientos o drogas analgésicas. (2)

3) Los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos; AINES, actúan a nivel periférico, aún cuando parece claro que existe también un mecanismo central. (12,13)

AGRESIÓN TISULAR

Todas las agresiones a los tejidos máxilo-faciales tienen orígenes múltiples, entre los cuales destacan:

- Las de causa infecciosa por microorganismos, principalmente bacterias, virus, hongos.
- Las traumáticas, que pueden ocurrir accidentalmente o por intervenciones quirúrgicas en la cavidad oral.
- Las carenciales, por insuficiente aporte vitamínico.
- Las provocadas, por pérdida de tolerancia inmunológica, es decir, las enfermedades autoinmunes: esclerodermia, dermatomiositis. (6,14,15)

Todas ellas conllevan a una respuesta por parte de los tejidos involucrados que se conoce como inflamación, lo cual implica la reacción de los vasos sanguíneos y comprende una serie de cambios que clínicamente se evidencian por calor, rubor, tumor, dolor. Estas manifestaciones producirán alteraciones en el territorio máxilo-facial y consecuentemente en su función. (6,16,17) La inflamación es una respuesta de carácter protector contra los agentes agresores, no obstante en ocasiones, la reacción inflamatoria puede ser perjudicial por su mismo mecanismo patogénico básico, de modo que los fármacos denominados AINEs potencian los efectos beneficiosos de la

inflamación controlando al mismo tiempo sus secuelas nocivas, de manera que sea útil para localizar y aislar, al mismo tiempo curar y reconstruir al tejido lesionado (18,19).

Las manifestaciones clínicas de la inflamación se producen por los llamados mediadores químicos, entre los cuales destacan los derivados del ácido araquidónico, conocidos como eicosanoides, los que desempeñan un lugar preponderante y son precisamente los AINEs los que contribuyen a aliviar los síntomas indeseables de la inflamación y a la restitución, en el caso que nos ocupa, de los tejidos afectados del aparato masticatorio. (18)

AINEs

Los denominados AINEs que son utilizados hoy en día, en su inmensa mayoría, inhiben las actividades de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) presente en diversos tejidos, la cual media reacciones fisiológicas y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) presente en el tejido lesionado. La inhibición de COX-2 media los efectos no deseados de la inflamación, pero la simultánea inhibición de COX-1 ocasiona efectos colaterales que son consecuencia de la disminución en la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (20,21).

Los AINEs, incluyen diversos compuestos, que aunque casi nunca tienen relación química alguna, sí comparten actividades terapéuticas y efectos colaterales. En este vasto grupo se incluyen los fármacos antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos y en la actualidad dentro de sus acciones farmacológicas deben considerarse sus efectos antiagregante plaquetario y antitumorigénico. (22,23)

PRINCIPALES GRUPOS QUÍMICOS DE AINES

- a) Salicilatos: ASA (ácido acetilsalicílico), diflunisal.
- b) Derivados pirazolónicos: aminofenazona (dipirona o metamizol), fenilbutazona.
- c) Derivados del para-aminofenol: acetaminofeno o paracetamol.
- d) Derivados del ácido acético: indometacina.
- e) Derivados carboxílicos y pirrolacéticos: ketorolaco
- f) Derivados del ácido fenilacético: diclofenaco, aclofenaco, tolmetina.
- g) Derivados del ácido antralínico: ácido mefenámico, clonixinato de lisina.

h) Derivados del ácido propiónico: ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, fenoprofeno.

i) Derivados enólicos: piroxicam, meloxicam, tenoxicam.

j) Metasulfonamidas: Nimesulide. (24)

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AINES

Han sido llamados eicosanoides las familias de prostaglandinas, leucotrienos y compuestos similares porque derivan de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos. En seres humanos, el ácido araquidónico (AA) es el precursor más abundante y proviene del ácido linoleico de los alimentos que se ingiere como parte de la dieta. El ácido araquidónico se encuentra esterificado a los fosfolípidos de membrana (figura N° 5). (25)

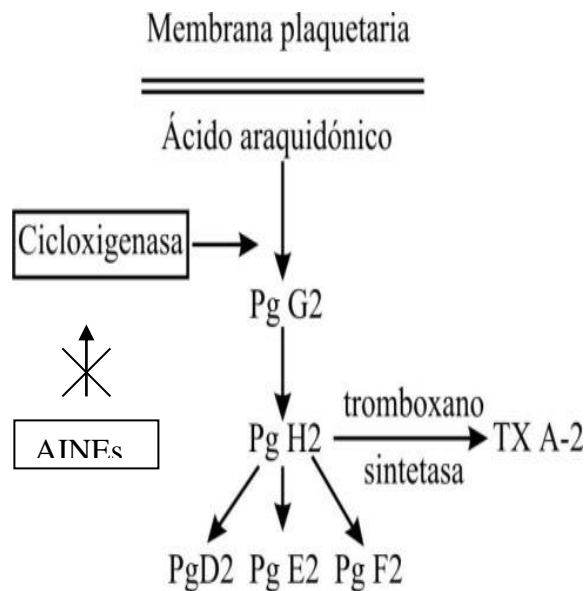


Figura 5. Mecanismo de acción de los AINEs.

Cuando se produce la agresión de los tejidos por diferentes agentes, se activa la fosfolipasa A2 (FLA2); esta enzima hidroliza el enlace de éster de fosfolípidos de membrana con la liberación de A.A. (25)

Enzimas que participan en la síntesis de prostaglandinas

La primera enzima en la vía de síntesis es la ciclooxigenasa de ácido graso.

Existen 2 isoformas de la enzima que son la COX-1 y la COX-2. La primera se expresa en forma constitutiva en casi todas las células. La COX-2, que es constitutiva en cerebro, pulmón, páncreas, riñón y ovario, necesita ser

inducida, se expresa en forma transitoria y casi exclusivamente en células inflamatorias estimuladas y promueve la formación rápida y en gran escala de mediadores de la inflamación. (23)

Los AINEs ejercen su actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la COX-2 en el sitio de la inflamación. Pero también estos fármacos son capaces de inhibir la COX-1 en los tejidos gastrointestinales y renal, lo que genera efectos indeseables y puede limitar su utilidad terapéutica, expresando en otros términos la relación beneficio riesgo de los AINEs, que dependerá de su capacidad de bloquear en mayor o menor grado a estas formas de COX (23,26).

COX-2 ocupa un rol constitutivo dentro de tejidos finos tales como el cerebro, el riñón, el páncreas, el intestino, y los vasos sanguíneos. (26)

El endoperóxido PGH₂ también es metabolizado en las plaquetas a TXA₂, sustancia poderosamente vasoconstrictora y agregante plaquetario, la tromboxano sintetasa es la enzima que media la formación de este mediador químico.

La PGI₂ es formada también a partir de PGH₂ por acción de la prostaciclina sintetasa, solamente a nivel de los endotelios. La PGI₂ tiene efectos opuestos al TXA₂, ya que es vasodilatadora y antiagregante. (27,28). En cambio el A.A.,

que es metabolizado por la lipooxigenasa (LOX), dará lugar a la producción de leucotrienos, que son sustancias hipersensibilizantes y vasoconstrictoras. Las prostaglandinas y leucotrienos son importantes mediadores del proceso inflamatorio y serán responsables de las manifestaciones clínicas de la inflamación.(28)

Otros posibles mecanismos de acción de los AINEs:

- Disminuyen la expresión de moléculas de adhesión celular (L-selectina) entre neutrófilos o células endoteliales
- Reestablecen los ciclos normales de muerte celular programada (apoptosis). Como efecto de esto se ha observado disminución de cáncer y tamaño de pólipos adenomatosos de colon en individuos con uso crónico de AINEs.
- Inhiben la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y la liberación de enzimas lisosómicas por polimorfonucleares neutrófilos (PMNN).
- Bloquean procesos asociados a la membrana celular. (29)

Recientemente se han desarrollado inhibidores altamente selectivos de la COX-2; entre los que han sido comercializados están el CeleCOXib en

febrero de 1999 y posteriormente el RofeCOXib, ambos autorizados por la *Food and Drug Administration* de EE.UU. Los COXibs son un nuevo tipo de fármacos antiinflamatorios capaces de inhibir selectivamente COX-2, sin inhibir COX-1 en todo su espectro terapéutico. Sin embargo, vienen apareciendo reportes cada vez más frecuentes por diversos autores donde proponen que la disminución de PGI2 con capacidad antiagregante y vasodilatadora secundaria a la inhibición de COX-2, sin inhibir el TXA2 (agente plaquetario), puede afectar el equilibrio entre prostaglandinas protrombóticas y antitrombóticas, aumentando la actividad protrombótica; la conclusión a priori sería que el uso de COXibs puede aumentar el riesgo cardiovascular, aunque esta hipótesis fisiopatológica precisa ser demostrada. (30)

REACCIONES ADVERSAS DE LOS AINEs

- *Gastrointestinales*: Mayor riesgo de ulceración, perforación y sangrado (2-4 %). En pacientes con antecedentes de úlcera péptica, enfermedad cardiovascular y edad mayor de 65 años, esofagitis, pancreatitis.
- *Renal*: Mayor riesgo de Insuficiencia renal, necrosis papilar, síndrome nefrótico, nefritis intersticial y fallo renal en insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis, insuficiencia renal y ancianos.

- *Cardiovascular*: Hipertensión arterial y secundariamente, infartos de miocardio y accidentes vasculares encefálicos. Mayor riesgo en pacientes que usan betabloqueadores.
- *Encefálico*: Mayor riesgo en pacientes que usan betabloqueadores.
- *Hematológicas*: Hemorragias por interferir con función antiagregante de las plaquetas, neutropenia y otras citopenias por fallo medular, principalmente con indometacina y fenilbutazona.
- *Respiratorio*: Asma, rinitis, anafilaxia.
- *Dermatológicas*: Eritema multiforme (Steven-Johnson), angioedemas, fotosensibilidad, urticaria.
- *Sistema nervioso central*: cefaleas, depresión, confusión, alucinaciones, trastornos de personalidad, pérdida de memoria, irritabilidad. El ibuprofeno, meningitis asépticas. (31,32)

DICLOFENACO SÓDICO

AINE que actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas; éstas desempeñan una acción importante respecto de la aparición de la inflamación, dolor y fiebre. Inhibidor tanto de COX-1 como de COX-2, sin embargo, muestra una mayor selectividad por COX-2, al igual que nimesulide, celecoxib y meloxicam. (33). Esto se ve mediante estudios que muestran una marcada

reducción en la excreción urinaria del metabolito TXB2 y solo una moderada inhibición en la agregación plaquetaria, tampoco influyó en el tiempo de sangrado y no mostró ningún efecto adverso (34). Se absorbe en forma rápida y luego de ingerir 50mg, las concentraciones plasmáticas alcanzan el valor máximo de 3,9 $\mu\text{mol/L}$ al cabo de 20 a 60 minutos. La mitad de la dosis se metaboliza en el hígado y se fija 99% a las proteínas séricas (albúminas). Se excreta 60% por orina en forma de metabolitos mientras que el resto se elimina por la bilis en las heces. Se usa en tratamientos breves de las siguientes afecciones agudas: procesos inflamatorios postraumáticos, reumáticos, extraarticular, infecciones dolorosas e inflamatorias de faringe, nariz, oído (ej.: faringoamigdalitis). Procesos dolorosos o inflamatorios en ginecología, anexitis, dismenorrea primaria. Estados dolorosos postoperatorios. Sus reacciones adversas incluyen: dolor epigástrico, náuseas, vómitos, diarrea. Con menor frecuencia hemorragias, úlcera péptica y en casos aislados colitis hemorrágica inespecífica y exacerbación de colitis ulcerativa). En el sistema nervioso central: cefaleas, mareos, vértigo. En raras ocasiones somnolencia y en casos aislados trastornos de la visión. A nivel dermatológico: erupción cutánea. En casos aislados: trombocitopenias, leucopenia, agranulocitosis, anemia hemolítica, anemia aplásica. A nivel renal: raras veces insuficiencia renal aguda, alteraciones urinarias, síndrome nefrótico. Induce reacciones de

hipersensibilidad: broncoespasmos, reacciones sistémicas anafilácticas, incluso hipotensión. Administrado en forma simultánea con preparados de litio o digoxina, puede elevar el nivel plasmático de éstos. Puede inhibir el efecto de los diuréticos. Se ha descrito que el peligro de hemorragias aumenta durante el empleo combinado de diclofenaco y anticoagulantes; puede aumentar la concentración sanguínea del metotrexato y elevar su toxicidad. La nefrotoxicidad de la ciclosporina puede ser mayor mediante los efectos antiinflamatorios no esteroideos del diclofenaco sobre las prostaglandinas renales (35).

NAPROXENO

Corresponde al 2-6-metoxi-2-naftilpropiónico ácido. MNPA. Es un AINE del grupo de los derivados del ácido propiónico; es un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. En varios estudios in vitro ha mostrado ser inhibidor de ambas enzimas COX-1 y COX-2. (36) Inhibe la agregación plaquetaria, prolonga el tiempo de sangrado y se han observado reacciones adversas tanto gástricas como renales (34). Se encuentra dentro de los AINEs con mayor selectividad por COX-1 junto al ibuprofeno, tolmetina, aspirina, indometacina. (36). Se absorbe completamente cuando se administra por vía oral, el pico plasmático se

alcanza entre las 2h a 4h. Se absorbe también por vía rectal. La vida media plasmática es de 14h. Este tiempo puede duplicarse en los ancianos. Se elimina del organismo por metabolización hepática. Se une 99% a las proteínas plasmáticas. Atraviesa la placenta y aparece en la leche de las mujeres que amamantan en alrededor de 1% de la concentración plasmática materna. Se usa en artritis reumatoidea, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artritis reumatoidea juvenil, gota aguda y trastornos musculoesqueléticos agudos (distorsión, distensión, trauma directo, dolor lumbosacro, espondilitis cervical, tenosinovitis y fibrositis). Entre las reacciones adversas las más frecuentes son náuseas, vómitos, dolor abdominal, epigastralgia. Reacciones más serias que pueden ocurrir ocasionalmente son: hemorragia gastrointestinal, úlcera péptica (con hemorragia y perforación) y colitis. Reacciones de hipersensibilidad y dérmicas: rash cutáneo, urticaria, angioedema, reacciones de anafilaxia, neumonitis eosinofílica, alopecia, eritema multiforme; síndrome de Stevens-Johnson, epidermólisis y reacciones de fotosensibilidad (porfiria cutánea o epidermólisis ampollar). Sistema nervioso central: cefalea, insomnio y dificultad para concentrarse. Hemáticas: trombocitopenia, granulocitopenia, anemia aplásica y hemolítica (raramente). Otras: tinnitus, deterioro en la audición, vértigo y edema periférico, ictericia, hepatitis, nefropatía, hematuria, alteraciones visuales, vasculitis, meningitis aséptica, estomatitis ulcerativa

(raramente). Como todos los AINEs presenta interacciones con hidantoínas, anticoagulantes, sulfonilureas administrados simultáneamente con naproxeno pueden aumentar la concentración sanguínea de droga libre de manera significativa. El efecto natriurético de la furosemida puede ser inhibido por el naproxeno. Inhibición renal de la depuración de litio. Al igual que otros AINEs puede disminuir el efecto antihipertensivo del propanolol y otros betabloqueantes. El probenecid alarga la vida media del naproxeno. El metotrexato disminuye la secreción de naproxeno a nivel de los túbulos renales (37)

VIA OXIDO NITRICO-GMP CICLICO

El óxido nítrico (NO) es un gas simple formado por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno, es considerado funcionalmente como un radical libre, fue inicialmente detectado como un mediador endógeno liberado desde las células endoteliales con efecto en la relajación vascular (38) y como inhibidor de la agregación plaquetaria y adhesión de los neutrófilos. Sintetizado desde el nitrógeno terminal de la L-arginina. Su síntesis es catalizada por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS). Se han caracterizado tres diferentes isoformas de esta enzima de acuerdo al origen celular y características bioquímicas. Dos enzimas constitutivas (cNOS) una de origen neuronal (nNOS)

o tipo 1 y otra endotelial (eNOS) o tipo 3 y una tercera inducible (iNOS) o tipo 2 (39). La actividad de las dos enzimas constitutivas es dependiente de calcio y producen NO en cantidades pequeñas y por tiempo corto. La NOS tipo 2 normalmente no se encuentra expresada; para hacerlo necesita un estímulo inmunológico/inflamatorio, es decir, la presencia de lipopolisacáridos (LPS) o de citoquinas inflamatorias, esta enzima es independiente de calcio y produce NO en cantidades mayores por períodos prolongados. (40). Una vez sintetizado el NO difunde fácilmente a los tejidos vecinos donde se une a la guanilato ciclasa soluble para activarla y catalizar la transformación de GTP en GMPc. (40).

El NO en el sistema nervioso central participa en la coordinación entre la actividad neuronal y el débito sanguíneo así como en la modulación del dolor, específicamente en analgesia periférica y central. Trabajos experimentales establecieron que la acetilcolina, sustancia que estimula la liberación de NO constitutivo, antagoniza la hiperalgesia inducida en ratas por PGE₂, así como en las contorsiones inducidas por ácido acético. (41). Estos efectos son bloqueados por un inhibidor de GMPc, lo que sugiere que el efecto antinociceptivo del NO en estas condiciones experimentales es mediado a través de la estimulación de GMPc, además se observó que durante la inflamación experimental inducida por carreginina, la administración local de L-arginina (precursor de NO) produce antinocicepción (42). Un reciente estudio

sugiere que una carencia local de NO en el asta dorsal puede inducir aumento en la actividad nociceptiva de las neuronas en este sector de la médula y por lo tanto, podría contribuir al dolor espontáneo (43). Otros estudios recientes dirigidos a estudiar la vía NO-GMPc en pacientes con dolor asociado a diferentes enfermedades, al igual que estudios experimentales, obtuvieron resultados que demuestran una absoluta inconsistencia, ya que se encuentran aumentadas las cantidades de NO en pacientes con enfermedades lumbodegenerativas, pacientes con migraña, con osteoartritis de la articulación temporomandibular (ATM). (44,45). Estas inconsistencias podrían deberse a la complejidad de los procesos envueltos en la regulación del dolor. La nocicepción involucra la interacción de una gran variedad de mecanismos que dependen además de una infinidad de estímulos, de la intensidad de los mismos y de otras condiciones asociadas a la enfermedad de base que ocasiona el dolor.

Distintos resultados clínicos y experimentales sugieren que el NO no tiene una participación importante como mediador del dolor, bajo condiciones fisiológicas por producción de las NOS constitutivas. Sin embargo en situaciones de lesión tisular, luego de un tiempo ocurrida la misma, se induce la expresión de la enzima calcio independiente, que lleva a la producción prolongada de grandes cantidades de NO en diferentes células (macrófagos,

neuronas, endotelio, células musculares lisas y estriadas, etc.). La sobreproducción de NO pasa a tener un papel importante en la hiperalgesia inducida por la propia lesión tisular así como por estímulos químicos. Es en esta última en que los inhibidores de la síntesis de NO suprimen la hiperalgesia resultante. Se ha demostrado que las concentraciones de las NOS aumentan notablemente en diferentes modelos animales de dolor. (46,47)

L-NAME

La inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) puede realizarse mediante sustancias análogas a la L-Arginina como son N^G-metil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) y N^G-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) que inhiben a las tres isoenzimas con diferente intensidad (48). En ratones, la inyección de formalina en la pata produce un comportamiento de lamido en dos fases, lo cual indica nocicepción (26). En los primeros 5 minutos después de la inyección de formalina existe una intensa respuesta nociceptiva, después un periodo de quietud y luego una segunda fase de moderada respuesta nociceptiva que puede durar desde los 10 a los 30 minutos después de la inyección. Es generalmente aceptado que la inyección de L-NAME intraperitoneal (i.p) no ejerce una gran influencia en la fase temprana provocada

por la formalina, aunque la fase tardía puede ser inhibida por un pre-tratamiento con L-NAME en ratones y ratas (49,50,51)

NALTREXONA

Los analgésicos opioides actúan estimulando receptores de tres tipos: mu (μ), kappa (κ) y delta (δ), los cuales se encuentran distribuidos en el sistema nervioso central y periférico, especialmente en zonas relacionadas con la transmisión del dolor. (52). La naltrexona (NTX) es un antagonista no selectivo de los receptores opioides, derivado directo de la morfina, tiene mayor afinidad por el receptor μ , por lo tanto, revierte todos los efectos producidos por los fármacos opioides debido a la activación de receptores del subtipo μ . Se usa principalmente en el tratamiento por intoxicación inducida por los opioides y el alcohol. Su mayor eficacia se encuentra a nivel oral. Algunos estudios in vitro y en animales sugieren que la administración de bajas dosis de antagonistas opioides, como naltrexona asociado al opioide mejora el efecto analgésico de este, lo que se debería a que la naltrexona sería capaz de bloquear los receptores con carácter excitatorio permitiendo una mejor respuesta analgésica al opioide y reduciendo los efectos secundarios (50).

HIPÓTESIS

La administración de diclofenaco y/o naproxeno produce actividad analgésica y antiinflamatoria, la que cual está modulada por el sistema opioide y nitridérgico, en el ensayo agudo experimental de la formalina en ratones.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la actividad antinociceptiva de diclofenaco y de naproxeno en el ensayo algesiométrico experimental de la formalina y estudiar la participación del sistema opioide y de la vía NO-GMP cíclico en dicha actividad.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la antinocicepción inducida por la administración intraperitoneal o sistémica de diclofenaco o de naproxeno en el test de la formalina.
2. Caracterizar la potencia analgésica de diclofenaco y de naproxeno.
3. Caracterizar la potencia antiinflamatoria de diclofenaco y de naproxeno.
4. Estudiar la participación del sistema opioide en la actividad de diclofenaco y de naproxeno, en el mismo modelo algesiométrico.
5. Evaluar el rol del de la vía NO-GMP cíclico en la actividad de diclofenaco y de naproxeno en el test de la formalina.

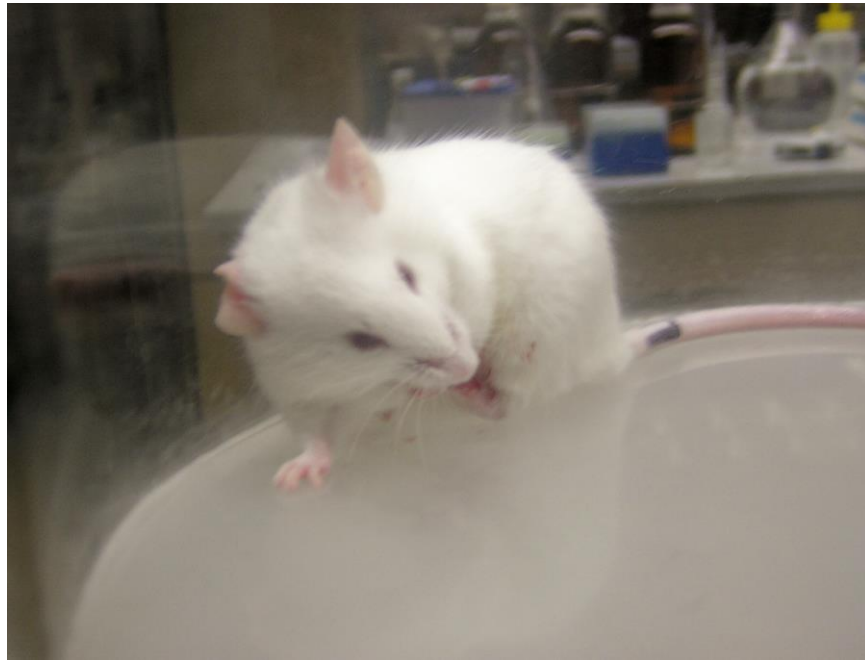
MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron 180 ratones de la cepa CF/1 (*Mus musculus*) tanto machos como hembras, de 28 a 30 gramos de peso, los que fueron aclimatados al ambiente del laboratorio (22-24° C) al menos dos horas antes de la experimentación. Esta fué realizada de acuerdo a un protocolo aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina, en que cada animal recibió solamente una dosis de las drogas, las observaciones fueron efectuadas en forma randomizada, ciega y controladas con solución salina. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después del experimento mediante dislocación cervical.



Fotografía 1. Ratones de la cepa CF/1 (*Mus musculus*)

La evaluación de la actividad nociceptiva se efectuó por el método de la formalina. Para ello se realizó una inyección subcutánea de 20 μ L de una solución de formalina al 5% en la superficie dorsal de la pata posterior izquierda. Los ratones se ubicaron en un cilindro transparente de 20 cm. de diámetro y 20 cm. de altura, especialmente diseñado para la observación y se midió el tiempo durante el cual ellos se lamieron la pata inyectada durante los 5 minutos siguientes a la inyección, que corresponde a la fase analgésica. Luego se esperó 10 minutos, y se volvió a medir el tiempo entre los 20 y los 30 minutos posteriores a la inyección, el tiempo total durante el cual los animales se lamieron la pata inyectada corresponde a la fase analgésica e inflamatoria. No se contabilizó el tiempo entre la fase analgésica y la inflamatoria, debido a que el ratón se encontraba en un período de quietud o de no actividad.



Fotografía 2. Ratón lamiéndose la pata izquierda previamente inyectado con formalina.

Los animales controles fueron inyectados, por vía intraperitoneal (i.p.) con solución salina al 0.9% y la evaluación fue idéntica a la de los animales tratados. Estos se inyectaron, por vía i.p. con diclofenaco (3 -100 mg/Kg.) y con naproxeno (3 -100 mg/Kg.) 30 minutos antes de la administración de la formalina. Para estudiar la participación del sistema opioide y del nitridérgico, se administró por la misma vía, 30 minutos antes de la inyección de AINEs, naltrexona (1mg/Kg), un antagonista de receptores opioides, más potente y de mayor duración que la naloxona o bien L-Name (10 mg/Kg), un inhibidor no

selectivo de las enzimas nitrosintasas (NOS). Se usó para cada dosis de fármacos un grupo de 6 ratones, al igual que para determinar las interacciones con naltrexona y L-NAME. En cambio, los animales controles, fueron evaluados a lo largo de todo el protocolo experimental, en número e 1 o 2, por cada grupo experimental.

Los fármacos se administraron por vía i.p. en un volumen de 10 ml/Kg, y el ensayo algesiométrico se realizó cuando se produjo el efecto máximo de cada droga, que fue determinado previamente y resultó ser de 30 minutos.

Para la evaluación de las drogas, se comparó el efecto del fármaco antes y después de la administración de naltrexona o de L-NAME y la significación estadística fué determinada por análisis de varianza y pruebas t de Student para muestras pareadas. La significación será considerada a un nivel de 5% ($p < 0.05$)

RESULTADOS

Grupo tratado con solución salina:

El pretratamiento de los ratones con la administración de 10 mL/kg de solución salina fisiológica, vía i.p. 30 minutos antes de la inyección de formalina produjo en promedio 139,71 segundos de lamido en la primera fase (n=34) y 169 segundos de lamido en la segunda fase (n=41).

Grupo tratado con diclofenaco:

La administración intraperitoneal de diclofenaco 30 minutos antes produce una disminución en el tiempo de lamido, de forma dosis dependiente. Al administrar 100 mg/Kg el tiempo de lamido disminuyó a 2 segundos en ambas fases. Al administrar 30 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 115,67 segundos en la primera fase y de 89,83 en la segunda fase. Al administrar 10 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 118,6 en la primera fase y 142 segundos en la segunda fase. Al administrar 3 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 121,7 en la primera fase y de 152,8 segundos en la segunda fase.

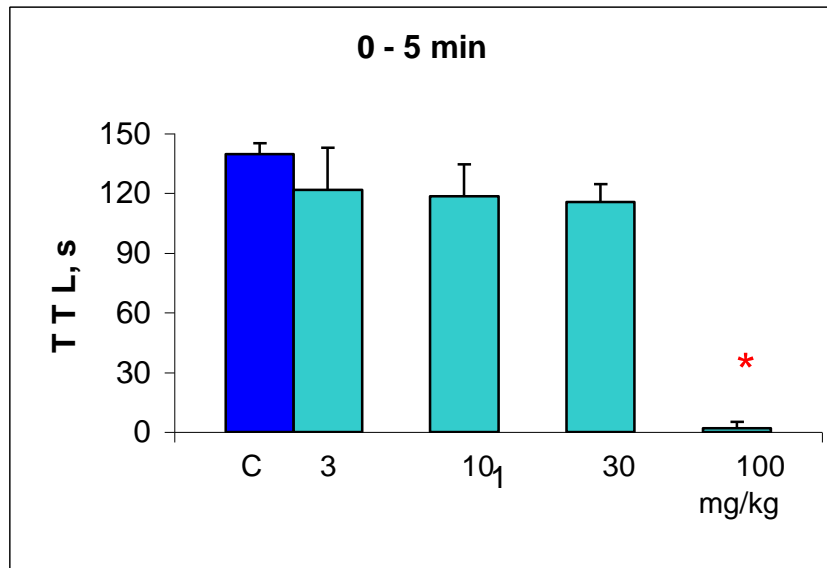


Fig 6 Histograma de la respuesta a diclofenaco (i.p.) en distintas dosis en el test de la formalina. Primera fase (0-5min.) * = significancia $p < 0,05$

C = Control

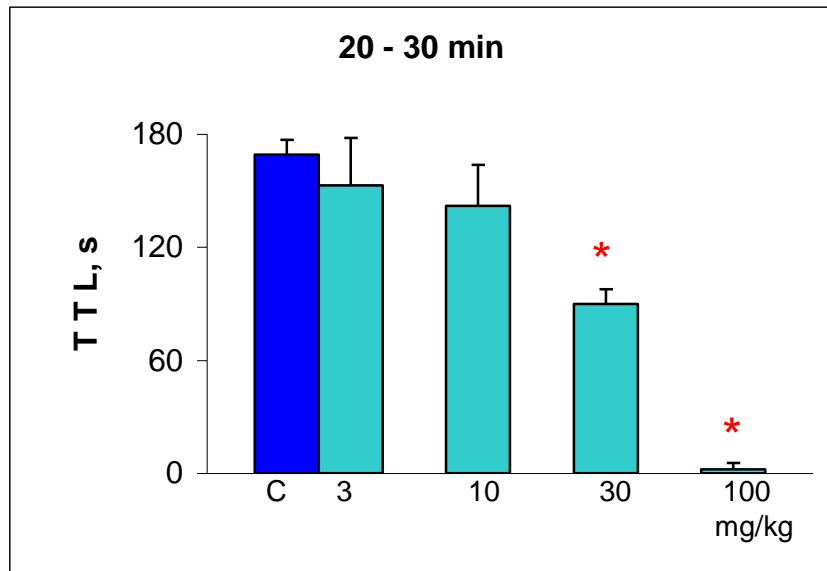


Fig 7 Histograma de la respuesta a diclofenaco (i.p.) ■ en distintas dosis en el test de la formalina. Segunda fase (20-30 min.) * = significancia $p < 0,05$ C = Control ■

Grupo tratado con naltrexona:

El grupo que fue tratado con naltrexona (1mg/Kg) 30 minutos antes de la inyección de formalina produjo en promedio 126,38 segundos de lamido en la primera fase (n=24) y 155,65 segundos en la segunda fase (n=20).

Grupo tratado con naltrexona y diclofenaco:

La administración de naltrexona 30 minutos antes del diclofenaco disminuye el tiempo de lamido en ambas fases excepto cuando se administran 100 mg/Kg de diclofenaco. Al administrar 100 mg/Kg de diclofenaco 30 minutos después de la naltrexona el tiempo de lamido es de 6,67 segundos en la primera fase y de 9 segundos en la segunda fase. Al administrar 30 mg/Kg el tiempo de lamido es de 39 segundos en la primera fase y 24,57 segundos en la segunda fase. Al administrar 10 mg/Kg el tiempo de lamido es de 62,67 segundos en la primera fase y de 23,8 segundos en la segunda fase. Al administrar 3 mg/Kg el tiempo de lamido es de 63,82 en la primera fase y de 115,83 en la segunda fase.

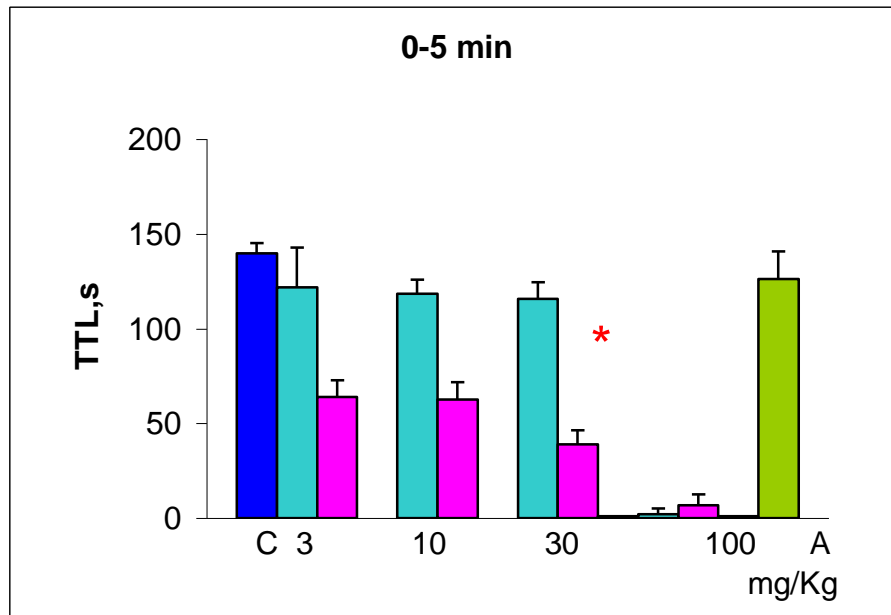


Fig 8 Histograma de la respuesta a diclofenaco (i.p.) previa administración de 1 mg/kg de naltrexona (NTX) en el test de la formalina. Primera fase (0-5 min.) * = significancia $p < 0,05$. C = control ; A = NTX

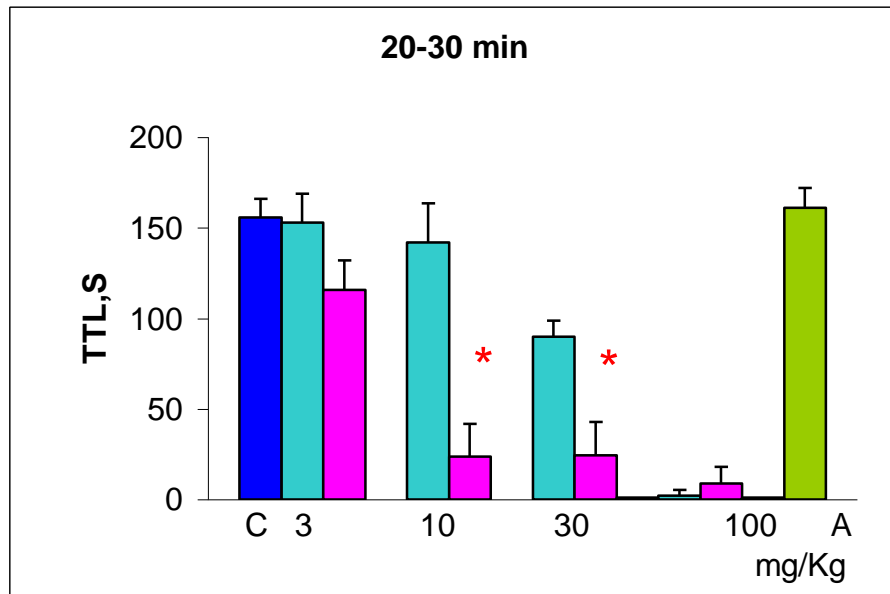


Fig 9 Histograma de la respuesta a Diclofenaco (i.p.) previa administración de NTX (1mg/Kg) ■ en el test de la formalina. Segunda fase (20-30 min.) * = significancia $p < 0,05$ C = control ■ ; A = NTX ■

Grupo tratado con L-NAME:

El grupo tratado con L-NAME (10mg/Kg) intraperitonealmente 30 minutos antes de la inyección de formalina produjo 126,38 segundos de lamido en la primera fase (n=24) y 155,65 segundos de lamido en la segunda fase (n=20).

Grupo tratado con diclofenaco y L-NAME:

La administración de L-NAME 30 minutos antes de la administración de diclofenaco produjo una disminución en el tiempo de lamido en ambas fases. Al administrar 100 mg/Kg de diclofenaco el tiempo de lamido es de 2 segundos en la primera y segunda fase. Al administrar 30 mg/Kg de diclofenaco el tiempo de lamido es de 40,17 en la primera fase y de 47,33 en la segunda fase. Al administrar 10 mg/Kg de diclofenaco el tiempo de lamido es de 60,2 en la primera fase y de 97,5 en la segunda fase. Al administrar 3 mg/Kg de diclofenaco el tiempo de lamido es de 68,83 en la primera fase y de 129,5 en la segunda fase.

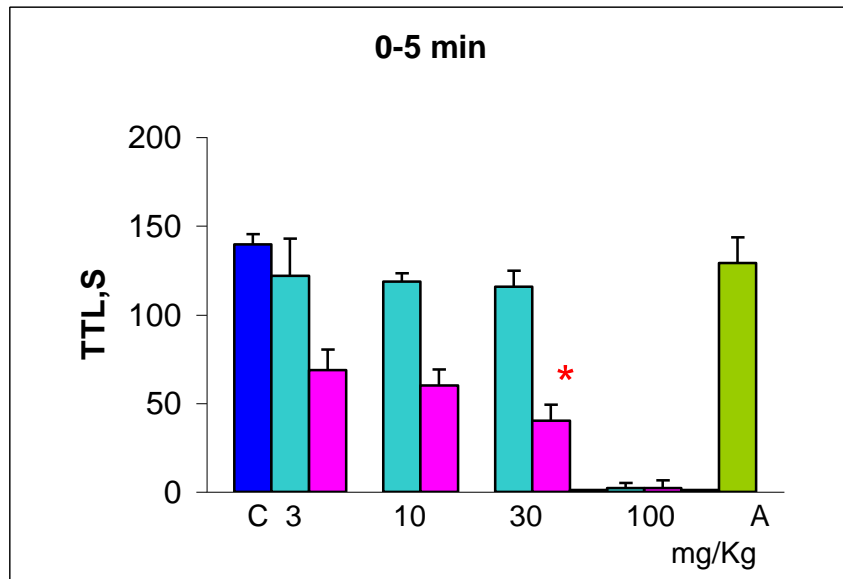


Fig 10 Histograma de la respuesta a diclofenaco (i.p) previa administración de 10 mg/kg de L-NAME ■ en el test de la formalina. Primera fase (0-5min) * = significancia $p < 0,05$ C = control ■ A = L-NAME ■

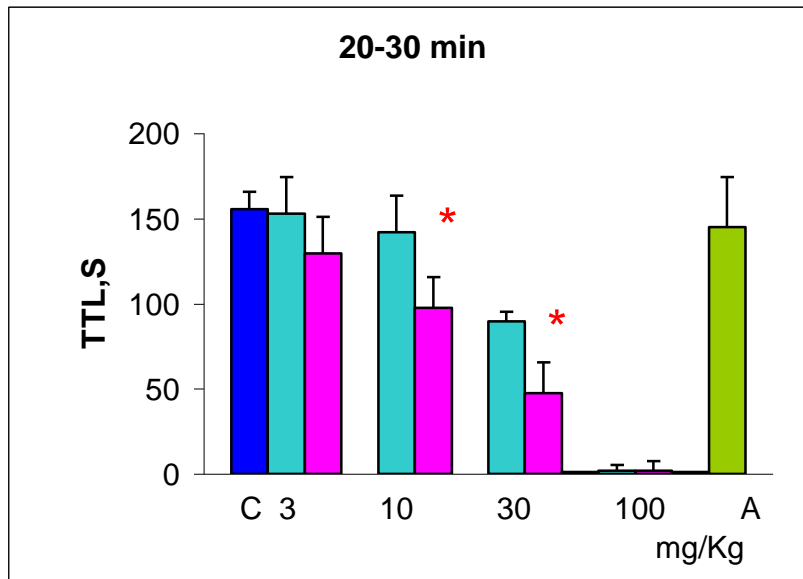


Fig 11 Histograma de la respuesta a diclofenaco (i.p) previa administración de 10 mg/Kg L-NAME ■ en el test de la formalina. Segunda fase (20-30min). * = significancia $p < 0,05$; C = control ■ ; A = L-NAME ■

Grupo tratado con naproxeno:

La administración intraperitoneal de naproxeno 30 minutos antes del test algesiométrico produce una disminución en el tiempo de lamido, dosis dependiente. Al administrar 100 mg/Kg el tiempo de lamido disminuyó a 38,67 segundos en la primera fase y a 118,6 en la segunda fase. Al administrar 30 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 94,6 segundos en la primera fase y de 122 en la segunda fase. Al administrar 10 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 113,8 en la primera fase y 126,2 segundos en la segunda fase. Al administrar 3 mg/Kg el tiempo de lamido fue de 137,3 en la primera fase y de 128 segundos en la segunda fase.

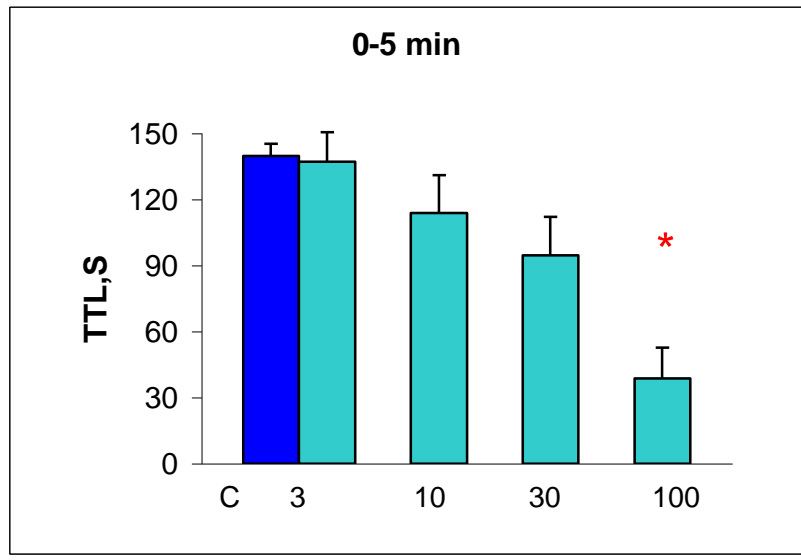


Fig 12 Histograma de la respuesta a naproxeno (i.p.) ■ en distintas dosis en el test de la formalina. Primera fase (0-5min.) * = significancia $p < 0,05$.

C = control ■

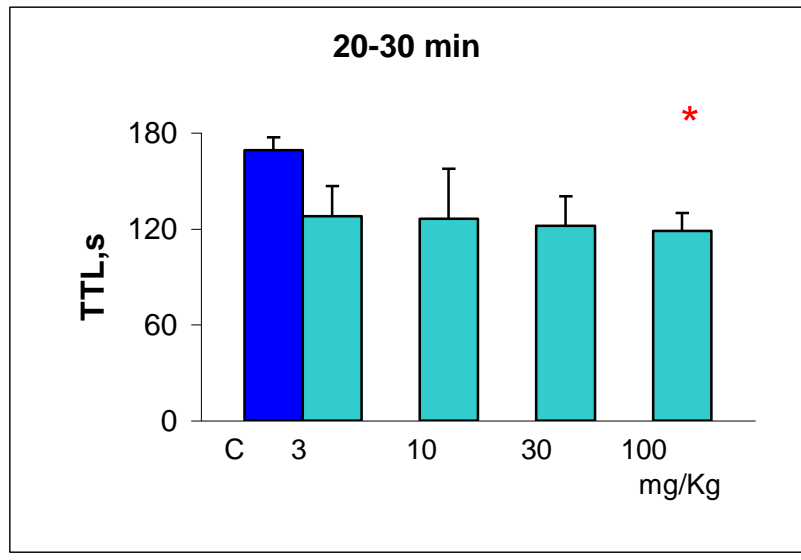


Fig 13 Histograma de la respuesta a naproxeno (i.p.) en distintas dosis en el test de la formalina. Segunda fase (20-30 min.) * = significancia $p < 0,05$; C = control

Grupo tratado con naltrexona y naproxeno:

Al administrar 1mg/Kg de naltrexona 30 minutos antes de la administración de naproxeno 100 mg/Kg produjo un tiempo de lamido de 72,17 segundos en la primera fase y de 71,33 segundos en la segunda fase. Al administrar 30 mg/Kg el tiempo de lamido es de 112,33 segundos en la primera fase y 142,75 segundos en la segunda fase. Al administrar 10 mg/Kg de naproxeno el tiempo de lamido es de 62,17 segundos en la primera fase y de 162,5 segundos en la segunda fase. Al administrar 3 mg/Kg el tiempo de lamido es de 79,6 en la primera fase y de 170,8 en la segunda fase.

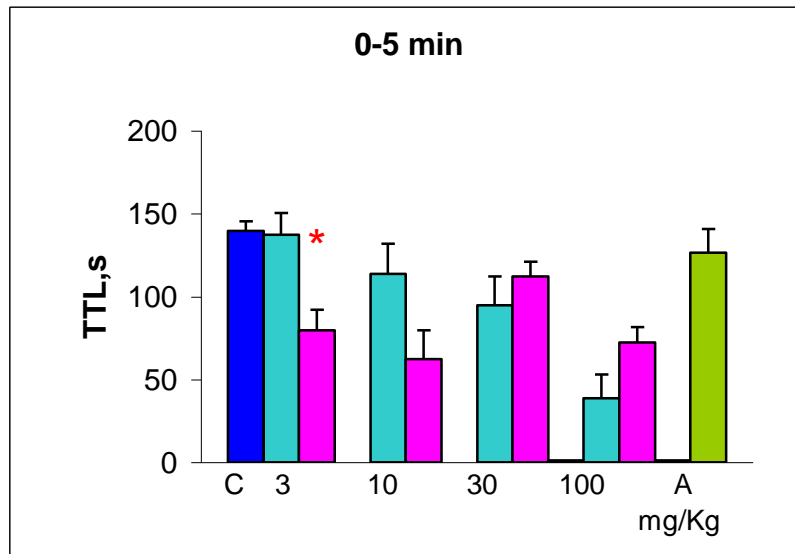


Fig 14 Histograma de la respuesta a naproxeno (i.p.) previa administración de 1 mg/kg de naltrexona (NTX) ■ en el test de la formalina. Primera fase (0-5 min.) * = significancia $p < 0,05$; C = control ■; A =NTX ■

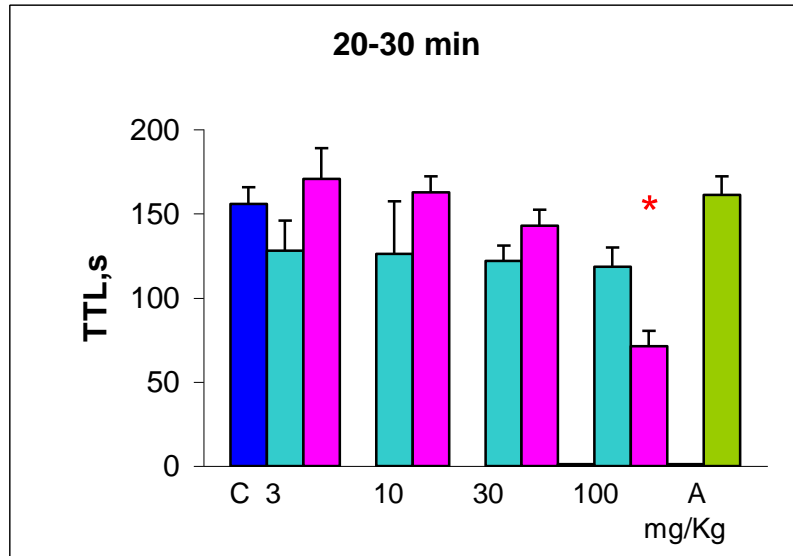


Fig 15 Histograma de la respuesta a naproxeno (i.p.) previa administración de NTX (1mg/Kg) ■ en el test de la formalina. Segunda fase (20-30 min.) * = significancia $p < 0,05$; C = Control ■ ; A = NTX ■

Grupo tratado con naproxeno y L-NAME:

La administración de L-NAME 30 minutos antes de la administración de naproxeno produjo una disminución en el tiempo de lamido en la primera fase. Al administrar 100 mg/Kg de naproxeno el tiempo de lamido es de 25,83 segundos en la primera fase y de 14,83 en la segunda fase. Al administrar 30 mg/Kg el tiempo de lamido es de 65,83 en la primera fase y de 92,83 en la segunda fase. Al administrar 10 mg/Kg de naproxeno el tiempo de lamido es de 73,8 en la primera fase y de 144,5 en la segunda fase. Al administrar 3 mg/Kg de naproxeno el tiempo de lamido es de 74,83 en la primera fase y de 146,33 en la segunda fase.

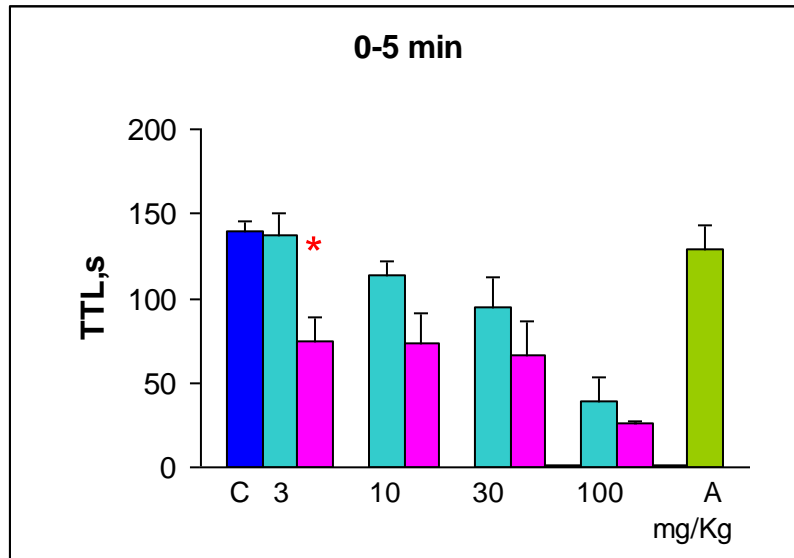


Fig 16 Histograma de la respuesta a naproxeno (i.p) previa administración de 10 mg/kg de L-NAME ■ en el test de la formalina. Primera fase (0-5min). * = significancia $p < 0,05$; C = control ■ ; A = L-NAME ■

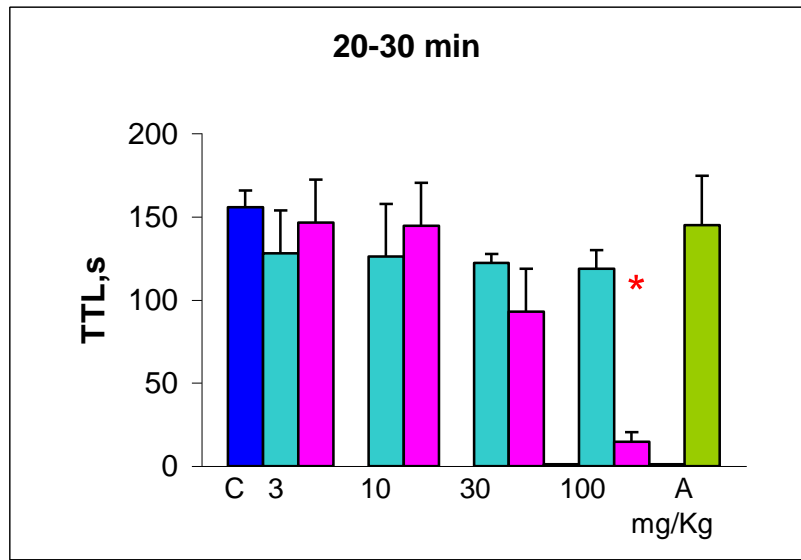


Fig 17 Histograma de la respuesta a naproxeno (i.p) previa administración de 10 mg/Kg L-NAME ■ en el test de la formalina. Segunda fase (20-30min). * = significancia $p < 0,05$; C = control ■ ; A = L-NAME ■

DISCUSION

El presente trabajo demuestra que la administración de diclofenaco y naproxeno, ambos administrados por vía i.p., producen una actividad antinociceptiva dosis dependiente, en el test de la formalina, tanto en la primera como en la segunda fase. La potencia relativa de diclofenaco resultó ser mayor que la del naproxeno tanto en la fase I como en la fase II. Este hallazgo sugiere que el diclofenaco es mejor analgésico y anti-inflamatorio que el naproxeno. Esta diferencia podría explicarse por la distinta selectividad inhibitoria de COX-1 y COX-2 que poseen los AINEs usados en el presente trabajo, presentando el diclofenaco una mayor selectividad por COX-2 y naproxeno por COX-1 (24).

El pretratamiento con naltrexona, que per se no posee actividad antinociceptiva en la primera o en la segunda fase del ensayo de la formalina, indujo un incremento de la actividad antinociceptiva del diclofenaco, tanto en la fase I como en la fase II, lo que hace suponer la participación del sistema opioide. Esto se debería a que la naltrexona sería capaz de unirse con distinta afinidad a los diferentes tipos de receptores opioides, induciendo un bloqueo de los sistemas autoinhibitorios presinápticos de la liberación de opioides endógenos, que se manifiesta en un aumento en la liberación de ellos, que conducen por un efecto modulador, a una mejor respuesta analgésica del

AINE (53). Sin embargo este efecto modulador de la naltrexona en la actividad antinociceptiva de los AINEs, parece ser dependiente de la capacidad inhibitoria de las COXs, ya que es significativamente mayor en los inhibidores de COX-2 (diclofenaco) que en los inhibidores de COX-1 (naproxeno).

Para evaluar el rol del de la vía NO-GMP cíclico en la actividad de diclofenaco y de naproxeno en el test de la formalina, se usó L-NAME, el cual administrado por via i.p. no produce efecto alguno en este ensayo algésiométrico. Esta carencia de actividad contribuye a la controversia de que el NO es capaz de producir analgesia e hiperalgnesia en los procesos nociceptivos (54). Por otra parte, el pretratamiento con L-NAME es capaz de incrementar en forma significativa el efecto de los AINEs en la primera fase y segunda fase del test de la formalina. Estos efectos se deberían, como se ha informado, para el caso de la morfina (55), a que el L-NAME inhibe, ya sea la síntesis o la liberación, tanto del sistema NO/GMPc como el del glutamato, que normalmente son liberados por la administración de formalina, especialmente a nivel de la médula espinal. Además podría deberse a una regulación diferenciada del NO en fibras nerviosas aferentes o a que el NO actúa como un mensajero molecular diferenciado en las distintas neuronas, dependiendo del carácter excitatorio o inhibitorio en una vía nociceptiva dada. Si actúa sobre neuronas excitatorias el efecto resultante será hiperalgnesia, en tanto que si el

NO induce activación de neuronas inhibitorias el efecto resultante será hipoalgesia. Este doble papel del NO en el sistema nervioso ha sido descrito en la actividad neuronal. Así el NO aumenta la actividad neuronal espinal frente a inflamación pero la deprime frente a un estímulo doloroso. (56)

El efecto del L-NAME, parece estar relacionado con la selectividad de los AINEs en su efecto inhibitorio de las COXs, puesto que es mayor en el caso de diclofenaco, inhibidor más potente de COX-2 que de COX-1, que en el caso del naproxeno, inhibidor de mayor potencia sobre COX-1 que sobre COX-2 (33).

En conclusión, la actividad antinociceptiva de los AINEs, en el ensayo algesiométrico de la formalina, es dependiente de la dosis y modulado por la actividad de los sistemas opioides y nitridérgicos.

CONCLUSIONES

- Diclofenaco y naproxeno producen antinocicepción dosis-dependiente al ser administrados por vía i.p. en el test de la formalina.
- Diclofenaco posee mayor potencia analgésica que naproxeno, lo que se debe probablemente, a su selectividad por COX-2.
- Naltrexona administrada i.p. no posee efecto antinociceptivo per se en el ensayo de la formalina
- Existe una participación del sistema opiode tanto en la actividad analgésica de diclofenaco como de naproxeno.
- L-NAME administrado i.p. no posee efecto antinociceptivo per se en el test de la formalina
- La actividad antinociceptiva de los AINEs es modulada por el sistema nitridérgico.

RESUMEN

En el presente trabajo, se investigó la actividad analgésica o antinociceptiva, de dos AINEs, con distinta selectividad inhibitoria de las ciclooxigenasas: diclofenaco y naproxeno, en un ensayo que mide dolor e inflamación: modelo de la formalina. Se usaron 180 ratones, machos y hembras, con un peso aproximado de 30 g. Los animales fueron inyectados en la superficie dorsal de la extremidad posterior izquierda con 20 μ L de solución de formalina al 5 % y se midió el número de veces que se lamieron la extremidad, durante los 30 minutos consecutivos a la inyección (fase I: 5 minutos posteriores a la inyección; fase II: 20 a 30 minutos finales). La participación de los sistemas opioide y NO/GMPc, en la acción desarrollada por diclofenaco y naproxeno, se evaluó con el pretratamiento de los animales con naltrexona y L-NAME, respectivamente. Los resultados demuestran que tanto en la fase I como en la fase II, el diclofenaco es más potente en su actividad analgésica y antiinflamatoria que el naproxeno. En la acción antinociceptiva de diclofenaco la participación del sistema opioide y del NO/GMPc es de mayor contribución que el caso del naproxeno. Los resultados obtenidos, podrían explicarse porque naltrexona y L-NAME, que aún cuando carecen de actividad analgésica en el modelo de la formalina por si solos, modulan en forma más importante el analgésico cuyo mecanismo de acción se debe a su efecto inhibitorio de COX2.

BIBLIOGRAFÍA

1. International Association for the study of pain. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definition of pain terms. Pain 1986; (Suppl): 1-222
2. Bonica JJ. Definitions and taxonomy of pain. En Bonica JJ. The management of pain. 2nd edition. Philadelphia: Lea & Febiger.1990: 18-27.
3. Bonica JJ. Definitions and taxonomy of pain. En Bonica JJ. The management of pain. 2nd edition. Philadelphia: Lea & Febiger.1990: 159-179
4. Maciewicz R., Martin JB. Pain: pathophysiology and management.En Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, MartinJB, Fauci AS, Root RK Principles of Internal Medicine. 12thedition. McGraw-Hill, New York,1991.
5. Nakamura A., Shiomi H. Recent advances in neuropharmacology of cutaneous nociceptors. Jpn J Pharmacol. 1999 Apr;79(4):427-31.
6. Ong CK., Seymour RA. Pathogenesis of postoperative oral surgical pain. Anesth Prog. 2003;50(1):5-17.
7. Klueber KM. Neuroanatomy for the dentist in the twenty-first century. J Dent Educ. 2003 Mar;67(3):366-9.

8. Schnitzler A., Ploner M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *J Clin Neurophysiol.* 2000 Nov;17(6):592-603.
9. Bromm B, Lorenz J. Neurophysiological evaluation of pain. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1998 Oct;107(4):227-53.
10. Longo VG. Past and future of neuropsychopharmacology. *Ann Ist Super Sanita.* 1990;26(1):5-10.
11. McHugh JM, McHugh WB. Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications. *AACN Clin Issues.* 2000 May;11(2):168-78.
- 12.. Bonica JJ. Definitions and taxonomy of pain. En Bonica JJ. *The management of pain.* 2nd edition. Philadelphia: Lea & Febiger.1990: 180-196.
13. International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. Classification of Chronic Pain. *Pain* 1986; 3 :S3-S12 y S216-S221
14. Armitage JD. Bone marrow trasplantation. *N Engl J Med* 1994;330:827.
15. Clark EA, Ledbestter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994;367:425

16. Metcalf D. Control of granulocytes and macrophages: molecular and clinical aspects. *Science* 1991;254:529.
17. Parillo JE. Pathogenic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med*, 1993; 328:327.
18. Gilry DW, Colville-nNach PR. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Vat Med* 1999; 5:698-701.
19. Malmstrom K, Daniel SE. Comparison of rofecoxib and celecoxib, two cyclooxygenase-2 inhibitors in postoperative dental pain. *Clin Ther* 1999;21:1053-03
20. Iñiguez MA, Pablos JL. Detection of COX-I and COX-2 isoforms in synovial fluid cells from inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* 1998;33:773-8.
21. Mc Adam BF, Catella-Lunson F. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX-2) the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;90:272-7.
22. Morita I, Schindler M. Differential intracellular locations for prostaglandin endoperoxide synthase 1 and 2. *J Biol Chem* 1995; 270:10902-8.

23. Brooks P, Emery P. Interpreting the clinical significance of different inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology* 1999;38:779-88.
24. Snyder M, Shugars DA, White RP, Phillips C. Pain medication as an indicator of interference with lifestyle and oral function during recovery after third molar surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Aug;63(8):1130-7.
25. Dennin EA. Diversity of group type regulation and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 1996; 209:13057-66.
26. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 1989 Sep;38(3):347-52.
27. Vane JR, Botting RM. Overview: mechanism of action of anti-inflammatory drugs. COX-2 enzyme inhibitors. Kluwer Academic Publishers- William Hawey Press; 1996:1-27.
28. Smith CJ. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13313-8.
29. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase I and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998;10:13-21.

30. Fosslie E. Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Clin Lab Sci.* 2005 Fall;35(4):347-85
31. Mc Carthy DM. Comparative Toxicity of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Am J Med.* 1999; 107 (6A): 375-475
32. Fauler J. Undesired effects of NSAIDS and coxibs. *MMW Forttschr Med.* 2005 Aug 4; 147 (31-32):31-5.
33. T.D. Warner, J.A. Mitchell, Cyclooxygenases: new form, new inhibitors, and lesson from the clinics. *Faseb J.*, 2004;18:790-804
34. Van Hecken A, Schwartz JI, Depre M, De Lepeleire I, Dallob A, Tanaka W, Wynants K, Buntinx A, Arnout J, Wong PH, Ebel DL, Gertz BJ, De Schepper PJ., Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2000 Oct;40(10):1109-20.
35. Tang W. The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab.* 2003 Aug;4(4):319-29.

36. Brideau C, Kargman S, Liu S, Dallob A, Ehrich EW, Rodger IW, Chan C-C. A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm Res*. 1996 Feb;45(2):68-74.
37. Hersh EV, Moore PA. Drug interactions in dentistry: the importance of knowing your CYPs. *J Am Dent Assoc*. 2004 Mar;135(3):298-311.
38. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.
39. Forstermann U and Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1995 Oct;352(4):351-64.
40. Moncada S, Lopez-Jaramillo P. Actividad biológica del endotelio vascular. *Investigación y ciencia*. 1991; 176: 60-6
41. Duarte IDG, Ferreira SH. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-Nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* .1992; 217:225-7

42. Osborne MG, Coderre TJ. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan induced thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1999. 126:1840-6
43. Trudrung P, Wirth U, Mense S., Changes in the number of nitric oxide-synthesizing neurones on both sides of a chronic transection of the rat spinal cord. *Neurosci Lett*. 2000 Jun 23;287(2):125-8.
44. Shimomura T, Murakami F, Kotani K. Platelet nitric oxide metabolites in migraine. *Cephalalgia* 1999 ; 19 :218-22.
45. Takahashi T, Kondoh T, Ohtani M. Association between arthroscopic diagnosis of temporomandibular joint osteoarthritis and synovial fluid nitric oxide levels. *Oral surg oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88:129-36.
46. Lin Q, Wu J, Peng YB. Nitric oxide-mediated spinal disinhibition contributes to the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 1999;81:1086-94
47. Callsen-Cencic P, Haheisel U, Kaske A. The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase under which condition is it up-or downregulated?. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 183-94.

48. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:191-220.
49. Moore PK, Handy RL., Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase-- is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci.* 1997 Jun;18(6):204-11. Review.
50. Sakurada T, Sugiyama A, Sakurada C, Tanno K, Sakurada S, Kisara K, Hara A, Abiko Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. *Neurochem Int.* 1996 Sep;29(3):271-8.
51. Malmberg AB, Yaksh TL. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology.* 1993 Aug;79(2):270-81.
52. Gonzalez A.,Dagnino J. Analgésicos Narcóticos. *Boletín Esc. De Medicina, P. Universidad Católica de Chile,* 1994;23:159-163
53. Gourlay GK. Advances in opioid pharmacology. *Support Care Cancer* 2005 13: 153-159

54. Prado W, Schiavon V, Cunha F, Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incisión pain in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 441: 57-65,
55. Watanabe C, Okuda K, Sakurada C, Ando R, Sakurada T, Sakurada S. Evidence that nitric oxide-glutamate cascade modulates spinal antinociceptive effect of morphine: a behavioural and microdialysis study in rats. *Brain Res*. 2003 Nov 14;990(1-2):77-86.
56. Luo ZD., Chaplan SR., Scot BP. Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. *J Neurosci*. 1999; 19: 9201-8.